动 物 学 研 究 2011，Dec. 32(6): 647−650 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2011.06647

PTEN 在小鼠卵细胞和早期胚胎发育中的功能研究

王喜宏[1,2,*], 和协超[1], 韩树标[1], 季维智[1], 郑 萍[1]

(1. 中国科学院昆明动物研究所, 云南 昆明 650223; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要：PI3K/AKT 信号通路在哺乳动物早期胚胎发育中起重要作用。抑癌基因 *PTEN* 是该通路中的负调节因子, 但 PTEN 在卵和早期胚胎中的表达、分布以及作用都还未见报道。本研究通过免疫荧光方法发现卵细胞及着床前胚胎都表达 PTEN, 且具活性的 PTEN 主要分布在生发泡期(germinal vesical, GV)卵细胞的皮层部位以及致密桑椹胚的卵裂球表面。在培养基中添加低浓度的PTEN特异性抑制剂bpV(pic), GV期卵母细胞的成熟不受影响, 但着床前胚胎发育受到阻滞。该结果提示 PTEN 在小鼠着床前胚胎发育中可能起重要作用。

关键词：卵细胞; 着床前胚胎发育; PTEN; bpV
中图分类号：Q954.4; Q593.4; Q132.4 **文献标志码**：A **文章编号**：0254-5853-(2011)06-0647-04

Role of PTEN in mouse pre-implantation development

WANG Xi-Hong[1,2,*], HE Xie-Chao[1], HAN Shu-Biao[1], JI Wei-Zhi[1], ZHENG Ping[1]

(1. *Kunming Institute of Zoology*, *the Chinese Academy of Sciences*, *Kunming* 650223, *China*;
2. *Graduate School of the Chinese Academy of Science*, *Beijing* 100049, *China*)

Abstract: The PI3K/Akt signal transduction pathway plays an important role in pre-implantation embryonic development. The tumor suppressor gene *PTEN* negatively regulates the PI3K/Akt pathway. Although PI3K is constitutively activated during pre-implantation embryonic development, currently no evidence shows the presence and possible involvement of PTEN in early embryo development. We investigated the expression of PTEN protein in germinal vesicle (GV) stage oocytes as well as in pre-implantation embryos. The activated form of PTEN was distributed in the peripheral of GV oocytes and compact morula. Treatment of GV oocytes with PTEN inhibitor bpV(pic) did not affect the maturation of the oocyte, but significantly impaired embryonic development. Thus, our study suggests the necessary role of PTEN in pre-implantation embryonic development.

Key words: Oocyte; Pre-implantation embryonic development; *PTEN*; bpV

磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)家族参与多种信号通路, 调节细胞的多种功能。正常情况下, 由其活化而产生的类脂产物 3,4,5-三磷酸磷脂酰肌醇 PtdIns(3,4,5)P3(PIP3)作为第二信使结合并激活多种细胞内的靶蛋白, 形成一个信号级联复合物, 最终调节细胞的增殖、分化、存活和迁移等(Manning & Cantley, 2007)。PI3K/AKT 信号通路保持正常的平衡状态是细胞维持正常生理活动的关键。PTEN 是一种 PtdIns(3,4,5)P3-磷酸酶, 它可以通过去磷酸化将 PtdIns(3,4,5)P3 转变为 PtdIns(4,5)P2(PIP2), 从而负调节 PI3K/AKT 信号通路的稳态。PIP2 也是一种重要的信号分子，可以与胞内或细胞膜上的许多蛋白质发生相互作用(McLaughlin & Murray,2005)。PTEN 的异常与多种肿瘤的发生、侵袭及转移密切相关(Keniry & Parsons, 2008)。因此，PTEN 是重要的抑癌因子之一, 在调节细胞正常生长也有着举足轻重的作用。

对 PI3K 信号通路在生殖和发育中的功能研究则相对较少, 但已有证据表明 PI3K 对着床前胚胎发育具重要意义。敲除 PI3K 的 p110b 催化亚基会引发早期胚胎致死(Bi et al, 2002)。应用时差显微技术(time lapse microscopy)也发现早期胚胎中有持续的 PtdIns(3,4,5)P3 生成, 抑制 PtdIns(3,4,5)P3 的产生可导致胚胎发育受阻, 说明PI3K/Akt通路对早期胚胎发育起调控作用(Halet et al, 2008)。在卵细胞中特异性敲除 PTEN, 可使滤泡提前发育和过度激

收稿日期：2011-06-16；接受日期：2011-08-15
*通讯作者(Corresponding author)，Tel/fax:+86-871-5198996, E-mail: wangxh06@post.kiz.ac.cn

活, 从而产生卵巢早衰(Reddy et al, 2008);而在颗粒细胞中特异敲除 PTEN 则可以增加排卵率和产仔数并延长黄体寿命(Fan et al, 2008)。在小鼠初级卵泡中特异敲除 PTEN 不能影响卵母细胞成熟、排卵和产仔数(Jagarlamudi et al, 2009)。但是到目前为止, PTEN 是否也在早期胚胎中表达并起一定的调控作用, 尚未见有关报道。我们利用免疫组化技术研究 PTEN 在小鼠卵和着床前胚胎中的分布, 并利用 PTEN 特异性抑制剂研究其在卵成熟及早期胚胎发育中的可能功能,其结果表明, PTEN 在卵细胞和早期胚胎中持续表达, 对早期胚胎发育可能起调控作用, 但抑制 PTEN 对卵细胞的成熟没有显著作用。

1 材料和方法

1.1 小鼠卵和胚胎的获取和培养

健康、性成熟的 ICR 品系 SPF (无特定病源)级小鼠购自昆明金殿动物中心。

超排方法:选择处于间情期和发情前期的雌性小鼠, 腹腔注射 PMSG(5 IU), 间隔 46～48 h 后腹腔注射 hCG(5 IU), 随即与雄鼠合笼, 翌日 8:00 检查阴栓, 有阴道栓者认为已完成交配行为。

胚胎的获取和体外培养：取出输卵管和子宫, 用消化或者冲洗的方法获得胚胎, 在实体显微镜下检查受精胚胎的发育阶段。一细胞(两原核期)胚胎培养在 KSOM 培养基中, 培养条件为 37 ℃, 5% CO_2。

GV(生发泡)卵的获取：PMSG 注射 48 h 后取出小鼠卵巢, 刺破卵泡获得质量好的 COCs, 用机械吹吸的方法去除颗粒细胞。GV 卵在 KSOM 培养中进行成熟培养, 培养条件同上。

培养中使用的 PTEN 抑制剂 bpV(pic)购自 Calbiochem(Cat：203705).

1.2 免疫组化

体内获取的不同发育阶段的胚胎用 PBS 洗两遍, 在 3.7%中性多聚甲醛中固定 15～20 min, 0.25% Triton-X100 中透膜 30 min, 1% BSA 封闭至少 1 h, 一抗 4 ℃过夜, 二抗室温 1 h, Hoechst 染核。在激光共聚焦显微镜下进行观察。

使用的一抗购自恩晶公司, PTEN(Ab-380/382/383)Antibody(cat：E021056), PTEN(Phospho-Ser380/Thr382/Thr383)Antibody(cat：E11056)。100×稀释。

1.3 统计分析

使用 Excel 软件卡方检验进行统计分析, $P<0.05$ 定义为差异显著。

2 结 果

2.1 PTEN 蛋白在卵细胞和早期胚胎中的表达和分布

我们首先利用 PTEN(Ab-380/382/383)抗体检测了 PTEN 总蛋白在卵细胞和早期胚胎中的表达和定位, 继而利用 PTEN(Phospho-Ser380/Thr382/Thr383)抗体检测了卵和胚胎中磷酸化的 PTEN 蛋白的表达和定位。这些位点上磷酸化的 PTEN 被认为是非活化形式(Salmena et al, 2008; Vazquez et al, 2001; Vazquez et al, 2000)。

对卵细胞及体内发育各阶段的胚胎进行总 PTEN 和磷酸化 PTEN 免疫荧光染色, 结果如图 1(大写 A-F 为磷酸化 PTEN, 小写 a-f 为 PTEN 总蛋白)。PTEN 总蛋白在着床前各阶段胚胎(图 1a-e)及卵细胞(图 1f)中都有表达, 主要分布在细胞核及近细胞膜上。磷酸化 PTEN 在一细胞、二细胞、四细胞及囊胚阶段与 PTEN 总蛋白的分布基本一致, 但在致密化桑葚胚阶段, 两者呈现不同的分布：PTEN 总蛋白同时分布在细胞核及卵裂球表面, 而磷酸化 PTEN 只分布在细胞核中。GV 期卵细胞 PTEN 总蛋白和磷酸化 PTEN 也存在分布上的差异, 总蛋白分布在细胞核和近细胞膜上(图 1f), 而磷酸化 PTEN 则分布在细胞核中(图 1F)

2.2 PTEN 在卵细胞成熟及早期胚胎发育中的作用

GV 期卵细胞在成熟培养中, 加入不同浓度(0 μmol/L、 1 μmol/L、10 μmol/L)PTEN 特异性抑制剂 bpV, 观察对生发泡破裂(Germinal vesicle breakdown, GVBD)的影响, 结果显示，不加 bpV(0 μmol/L)和加 1 μmol/L、10 μmol/L bpV 的 GVBD 率分别为 86.4%和 86.2%、84.6%, 无显著差异($P>0.05$)。

取一细胞(两原核期)胚胎在 KSOM 中培养, 培养基中添加 0 μmol/L(对照)、2.5 μmol/L、5 μmol/L 以及 10 μmol/L 浓度梯度的 bpV, 每天观察并记录各组胚胎发育的情况。我们发现 bpV 的添加显著抑制胚胎发育, 而且抑制的程度与浓度正相关。在浓度较低(2.5 μmol/L 和 5 μmol/L)时, 二细胞以后发育到每个阶段的胚胎数都有所下降, 经过卡方检验, 2.5 μmol/L 和 5 μmol/L 两组的四细胞、桑椹胚、囊胚的发育率与对照组相比具都有显著差异($P<0.05$)。在较高浓度(10 μmol/L)时没有胚胎可以发育到囊胚, 几乎所有胚胎的发育全部被抑制在二细胞时期(图 2)。

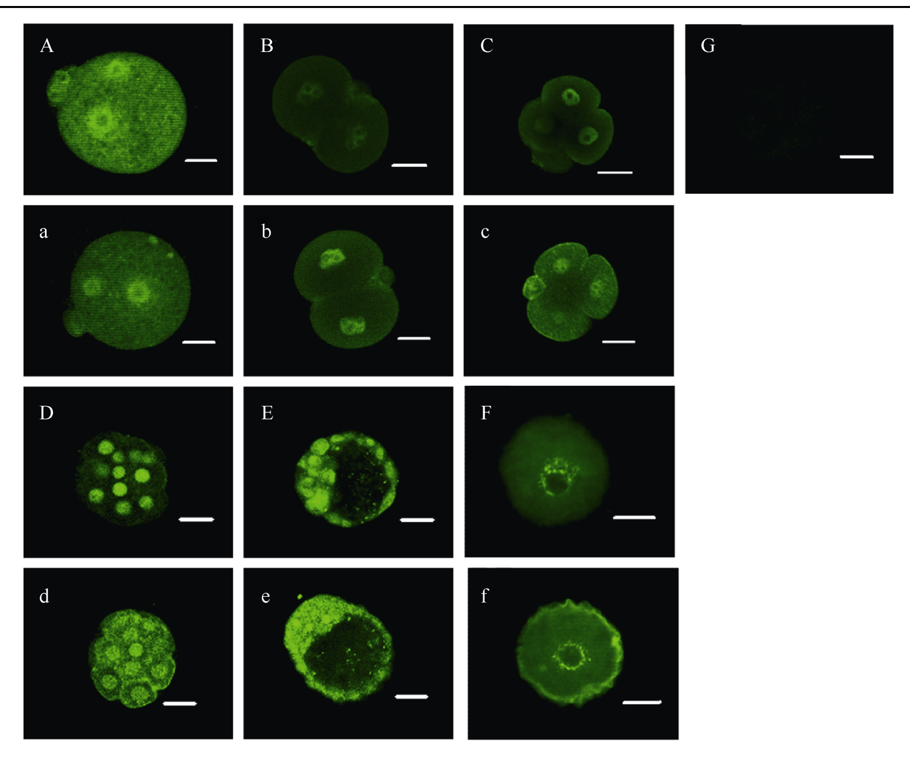


图 1　胚胎发育各阶段以及 GV 卵的磷酸化 PTEN 和总 PTEN 的分布

Fig. 1　Distribution of PTEN and phosphorylated-PTEN in pre-implantation embryos and GV oocytes

PTEN (Phospho-Ser380/Thr382/Thr383) Antibody(磷酸化 PTEN)以及 PTEN (Ab-380/382/383) Antibody (总 PTEN)两种抗体对胚胎以及 GV 卵的免疫荧光染色结果。二抗为 Alexa Fluor 488，绿色荧光。注意在致密桑椹胚阶段和 VG 卵中，总 PTEN 和磷酸化 PTEN 的分布有所不同。A～E) 胚胎发育各阶段磷酸化; a～e) 胚胎发育各阶段总 PTEN 免疫组化结果; F) GV 卵磷酸化 PTEN 免疫组化结果; f) GV 卵总 PTEN 免疫组化结果。G,) 二细胞胚胎只加二抗的对照，其他阶段情况基本相同，都是几乎没有任何荧光。Bar=20 μm。

Immunofluorescent staining of GV oocytes by PTEN (Phospho-Ser380/Thr382/Thr383) antibodies specific for the phospho-PTEN or with PTEN (Ab-380/382/383) Antibody specific for total PTEN. The embryos were then incubated with a secondary antibody, Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit (green fluorescence). Note that total PTEN and p-PTEN located differently in compact morula and GV oocyte. A-E) phospho-PTEN in preimplantation embryos; a-e) total PTEN in preimplantation embryos; F) phospho-PTEN in GV oocytes; f) total PTEN in GV oocytes; G) a control with the secondary antibody alone. Bar=20 μm.

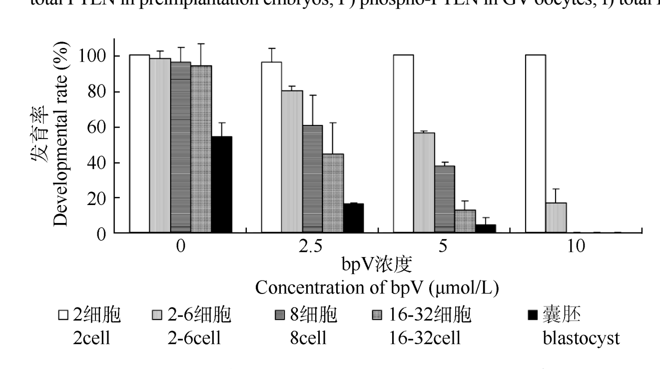


图 2　PTEN 抑制剂 bpV(pic)处理对早期胚胎发育的影响

Fig. 2　Effect of pbV(pic) treatment on the developmental competence of early embryos

在培养基中添加 0 μmol/L(对照)、0.5 μmol/L、2.5 μmol/L 和 10 μmol/L 的 bpV(pic)，统计 2 细胞、4-6 细胞、8 细胞、16-32 细胞及囊胚的各阶段胚胎发育率。0.5 μmol/L、2.5 μmol/L 和 10 μmol/L 三组与对照组相比，在二细胞以后的所有发育阶段，发育率均差异显著(P<0.05)。

One-cell embryos were cultured continuously in the presence of 0 μmol (control), 0.5 μmol/L, 2.5 μmol/L and 10 μmol/L bpV(pic). The developmental rate was valued at the following stages (left to right): two-cell, four to six-cell, eight-cell, 16-cell morula and early blastocyst. About 50 embryos were scored in each experimental condition. The development rate had significant difference between test group and control group in all stage beyond 2 cells (P<0.05).

3　讨　论

PI3K 通路在小鼠胚胎发育中起重要作用，在小鼠胚胎中，PI3K 从一细胞胚胎到囊胚都持续表达并激活，PI3K 和其磷酸化反应的产物 PtdIns(3,4,5)P3 都分布在细胞表面(Halet et al, 2008; Riley & Carayannopoulos, 2005)。敲除 PI3K 催化亚基或者抑制 PI3K 活性可引起早期胚胎致死(Bi et al, 2002; Halet et al, 2008)。PTEN 是 PtdIns(3,4,5)P3 发生的负调控因子，所以在胚胎发育中很可能也有重要的作用。

我们的结果表明，PTEN 在卵母细胞和早期胚胎发育中持续表达。利用 PTEN 特异性抑制剂 bpV 阻断 PTEN 的活性，可显著影响早期胚胎发育潜能，其效果具剂量依赖性，说明 PTEN 对早期胚胎发育具调控作用。PTEN 总蛋白和磷酸化蛋白在桑葚胚阶段卵分布不一致，活化的 PTEN 主要分布在裂球表面。该结果暗示 PTEN 可能在桑葚胚阶段的致密

化过程中起某种作用。低浓度的 bpV 并不能阻断卵泡的成熟，这与前人基因敲除的研究结果一致：在小鼠在初级卵泡中敲除 PTEN 不能影响卵母细胞成熟(Jagarlamudi et al, 2009)。

本实验中使用的 bpV 最大浓度为 10 μmol/L, 本实验证明该浓度对于体细胞和卵细胞都没有毒性(Lai, 2007; Schmid et al, 2004; Li et al, 2010)。因此，在该浓度的 bpV 作用下观察到的表型应该是 PTEN 活性抑制后产生的真实作用，而不是细胞毒性的副产物。当然, PTEN 对胚胎发育的作用还需通过 mRNA 表达的定量研究，以及 *PTEN* 基因表达的干扰，如 RNA 干扰或者基因敲除手段进行更为确凿的验证。抑制 PTEN 的功能，一方面可破坏 PI3K/AKT 通路的平衡，使 AKT 过度激活；另一方面也可降低信使分子 PIP2 的生成。PTEN 对胚胎发育调控的详细分子机制还需进一步的深入研究。

参考文献：

B i L, Okabe I, Bernard DJ, Nussbaum RL. 2002. Early embryonic lethality in mice deficient in the p110 catalytic subunit of PI 3-kinase[J]. *Mamm Genome,* **13**(3): 169-172.

Fan HY, Liu Z, Cahill N, Richards JAS. 2008. Targeted disruption of Pten in ovarian granulosa cells enhances ovulation and extends the life span of luteal cells[J]. *Mol Endocrinol,:* **22**(9): 2128-2140.

Halet G, Viard P, Carroll J. 2008. Constitutive PtdIns (3, 4, 5) P3 synthesis promotes the development and survival of early mammalian embryos[J]. *Development,* **135**(3): 425.

Jagarlamudi K, Liu L, Adhikari D, Reddy P, Idahl A, Ottander U, Lundin E, Liu K. 2009. Oocyte-specific deletion of Pten in mice reveals a stage-specific function of PTEN/PI3K signaling in oocytes in controlling follicular activation[J]. *PLoS One,* **4**(7): e6186.

Keniry M, Parsons R. 2008. The role of PTEN signaling perturbations in cancer and in targeted therapy[J]. *Oncogene,* **27**(41): 5477-5485.

Lai J. 2007. Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten (PTEN) as a molecular target in lung epithelial wound repair[J]. *Br J Pharmacol,* **152**(8): 1172-1184.

Li J, Kawamura K, Cheng Y, Liu S, Klein C, Duan EK, Hsueh AJW. 2010. Activation of dormant ovarian follicles to generate mature eggs[J]. *Proc Natl Acad Sci USA,***107**(22): 10280.

Manning BD, Cantley LC. 2007. AKT/PKB signaling: navigating downstream[J]. *Cell,* **129**(7): 1261-1274.

McLaughlin S, Murray D. 2005. Plasma membrane phosphoinositide organization by protein electrostatics[J]. *Nature,* **438**(7068): 605-611.

Reddy P, Liu L, Adhikari D, Jagarlamudi K, Rajareddy S, Shen Y, Du C, Tang W, H m l inen T, Peng SL. 2008. Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool[J]. *Science,* **319**(5863): 611.

Riley JK, Carayannopoulos MO. 2005. The PI3K/Akt pathway is present and functional in the preimplantation mouse embryo[J]. *Dev Biol,* **284**(2): 377-386.

Salmena L, Carracedo A, Pandolfi PP. 2008. Tenets of PTEN tumor suppression[J]. *Cell,* **133**(3): 403-414.

Schmid AC, Byrne RD, Vilar R, Woscholski R. 2004. Bisperoxovanadium compounds are potent PTEN inhibitors[J]. *FEBS lett,,* **566**(1-3): 35-38.

Vazquez F, Grossman SR, Takahashi Y, Rokas MV, Nakamura N, Sellers WR. 2001. Phosphorylation of the PTEN tail acts as an inhibitory switch by preventing its recruitment into a protein complex[J]. *J Biol Chem,* **276**(52): 48627.

Vazquez F, Ramaswamy S, Nakamura N, Sellers WR. 2000. Phosphorylation of the PTEN tail regulates protein stability and function[J]. *Mol Cell Biol,* **20**(14): 5010.